

USEFUL MICROORGANISM AND METHOD FOR UTILIZATION THEREOF

Patent Number: JP3236771
Publication date: 1991-10-22
Inventor(s): SUEYOSHI TADASHI; others: 02
Applicant(s):: MEIJI SEIKA KAISHA LTD
Requested Patent: ☐ JP3236771
Application Number: JP19900029544 19900213
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N1/20 ; C09K17/00
EC Classification:
Equivalents: JP2553727B2

Abstract

PURPOSE: To obtain a useful microorganism excellent in oil reducing and deodorizing effects on wastes, excreta, etc., by using *Bacillus subtilis* BN1001 having specific mycological properties as an ingredient.

CONSTITUTION: *Bacillus subtilis* BN1001 newly separated from soil has the following bacteriological properties. (A) morphological properties; (1) a nutrient cell cultured in bouillon agar is bacillus of 0.5-0.7X1.5-3.0 μ size, (2) positive to Gram staining, (3) forming endospores by culturing at 30 deg.C for 2-3 days, an elliptical shape of 0.5-0.7X0.8-1.5 μ , etc., (R) culturing properties; (1) well growing by culturing at 30-45 deg.C for 1-3 days in a normal agar culture medium, (2) well growing in bouillon agar with colonies assuming a brown creamy shape without producing diffusive pigments, etc., (C) physiological properties; (1) positive to reducing properties with nitrates, (2) negative to denitrifying reaction, (3) positive to the Voges-Proskauer (VP) reaction, (4) negative to the methyl red (MR) test, (5) positive to hydrolysis properties of starch, etc.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑫ 公開特許公報(A)

平3-236771

⑬ Int. Cl.⁵
C 12 N 1/20
C 09 K 17/00
C 12 N 1/20
// (C 12 N 1/20
C 12 R 1:125)

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)10月22日

F 7236-4B
C 6742-4H
D 7236-4B

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全7頁)

⑮ 発明の名称 有用微生物及びその利用方法

⑯ 特 願 平2-29544

⑰ 出 願 平2(1990)2月13日

⑱ 発 明 者 末 吉 忠 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社生物科学研究所内
⑲ 発 明 者 栄 田 利 章 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社生物科学研究所内
⑳ 発 明 者 日 高 秀 昌 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社生物科学研究所内
㉑ 出 願 人 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号

明 細 書

1. 発明の名称

有用微生物及びその利用方法

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の菌学的性質を有するバチルス・サブ

チリス BN1001 (Bacillus subtilis BN1001)

- (1) かん菌
- (2) グラム染色：陽性
- (3) 内生胞子を形成、長円形
- (4) 運動性あり
- (5) 抗酸性染色：陰性
- (6) 普通寒天培地：よく生育
- (7) 肉汁寒天培地：生育は良く、集落は茶色
クリーム様
- (8) 肉汁液体培地：表面に白色の菌膜を形成
- (9) 硝酸塩の還元性：陽性
- (10) V.P反応：陽性
- (11) スターチの加水分解性：陽性
- (12) カタラーゼ：陽性

(13) クエン酸の利用性：陽性

(14) アルギニンの分解性：陰性

(15) インドールの生成：陽性

(16) 硫化水素の生成：陰性

(17) オキシダーゼ：陽性

(18) ウレアーゼ：陰性

(19) リジンデカルボキシラーゼ：無陽性

(20) 耐食塩性：10%食塩添加肉汁寒天培地上
で生育

(21) 生育温度：25~45℃の温度範囲でよく生
育

(22) O/Fテスト：O型

(23) ヒューレイフソン培地による糖の利用性
：D-グルコース、L-アラビノース、D-キ
シロース、D-マンニトール、ソルビトール、
シュクロースからの酸の生成が認められるが、
ガスの発生は認められない

イノシトール、ラムノース、メリビオース、
ラフィノースからの酸とガスの生成は認められ
ない

- (2) バチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤を用いて油脂を分解する方法
- (3) バチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤を用いて悪臭を除去する方法
- (4) バチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤を用いて悪臭の発生を抑制する方法
- (5) バチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤を用いて富栄養水の濁りを除去する方法
- (6) バチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤を用いて動物の増体を図る方法
- (7) バチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤を用いて土壌を改善する方法
- (8) バチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤を用いて有機肥料を調製する

グ剤等の脱臭剤が市販されている。しかし、 n ヘキサン抽出物質の減少、スカムの分解、脱臭、悪臭発生防止に満足できるものは少ない。特に近年の高年齢化に伴い高血圧薬あるいは糖尿病薬等を服用する人が増え、従来の糞尿臭とは異なる臭気がトイレおよびその周辺を支配し、その対策に苦慮している関係者が多い。また養魚場、養豚場、うづら養育場その他動物の糞尿臭も作業者や周辺の住民にとっても苦痛の種である。また近年、観賞魚等を水槽あるいは池で飼育する人が増えているが、水槽あるいは池から発する臭気および水の交換等に悩む人が多い。また植物を愛好する人も多く、土壌を改善し、きれいな植物を生育したいという要望もある。また、経済動物を効率的に飼育することができればという要望も多い。

〔発明が解決しようとする課題〕

家庭あるいは各種事業所から排出される含油排水中の n ヘキサン抽出物質を減らしたいという技術分野、厨房の排水槽にたまるスカムを分解しかつこのスカムから発生する悪臭を消臭したいと

る方法

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はバチルス・サブチリスBN1001 (*Bacillus subtilis* BN1001) 及び含油排水中の n ヘキサン抽出物質を減じる方法、厨房等の排水槽にたまるスカムを分解する方法、排水廃物及びトイレ等からの悪臭を除去する方法、悪臭の発生を抑制する方法、浄水化を図る方法、土壌を改善する方法、有機肥料とする方法、飼料効率の改善を図り、動物の増体を図る方法、に関するものである。

〔従来の技術〕

環境保全の立場から、家庭あるいは各種事業所から排出される含油排水中の n ヘキサン抽出物質の規制強化が叫ばれている。また、家庭あるいは各種事業所から排出される排水廃物、スカム等とりわけ不快感を放つものに対しては、脱臭処理が要求されその処理のために、あるいはこれから発生するであろう悪臭の防止に、色々なマスクン

いう技術分野、家庭あるいは各種事業所から排出される排水廃物等から発する不快な臭気を軽減あるいはなくしたいという技術分野、これから悪臭発生が予測されるところの悪臭発生の防止を図りたい技術分野、トイレあるいは浴室を含めた各種動物の排泄する糞尿からの臭気を軽減あるいはなくしたいという技術分野、また生ゴミや各種動物の排泄する糞尿等を有機肥料として再利用したいという技術分野、観賞魚を飼育する水槽あるいは池から発する臭気の軽減および浄水技術分野、土壌を改善したいという技術分野、経済動物の飼育効率向上を求める技術分野で安全性にすぐれかつ改善効果を有し満足できるような培養生菌体及び生菌剤を提供することが本発明の課題である。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、含油排水中の n ヘキサン抽出物質を減ずる微生物を発見すべく、各地域の土壌より微生物のスクリーニングを実施した結果、バチルス属に属する新しい菌を発見し、これをバチルス・サブチリスBN1001と名した。

このバチルス・サブチリス BN 1001 の培養生菌体を含む排水で試験するうちに減油効果の他に脱臭効果を見出し、家庭あるいは各種事業所から排出される排水汚物と見れば不快臭を発生する所からの脱臭効果を迅速に確認した。さらにトイレや各種動物の糞尿の臭気も不快を覚えない程に軽減すること、生ゴミ等これから悪臭の発生が予測される場所で悪臭発生が抑制されること、各種動物の糞尿は有機肥料として再利用できること、脱臭魚飼育水槽や池での臭気および浄水効果も見出した。さらに土壌に入れよく混ぜた後、被物の臭を消いたところその生育の良さを発見、また各種経済動物の飼料に添加した結果、飼料利用効率の向上、動物の増体が図られることも発見した。このような新しい知見を得、更に確認し試験した結果、本発明が完成されたのである。

すなわち、本発明はバチルス・サブチリス BN 1001 の培養生菌体及び生菌剤に関する。

本発明の菌株は、本発明者らが土壌から新たに分離したバチルス・サブチリス BN 1001 であ

る

- (5) スキムミルク培養：アルカリ性を呈し、ペプトン化される

C. 生理的性質

- (1) 硝酸塩の還元性：陽性
- (2) 脱窒反応：陰性
- (3) VP 反応：陽性
- (4) MR テスト：陰性
- (5) スターチの加水分解性：陽性
- (6) 硝酸塩およびアンモニウム塩を利用する
- (7) 色素の生産：顕著な水溶性および非水溶性色素を生成しない
- (8) カタラーゼ：陽性
- (9) クエン酸の利用性：陽性
- (10) アルギニンの分解性：陰性
- (11) インドールの生産：陰性
- (12) 硝化水素の生成：陰性
- (13) オキシダーゼ：陽性
- (14) クレアーゼ：陰性
- (15) リジンデカルボキシラーゼ：弱陽性

り、本菌の細菌学的性状は次の通りである。

A. 形態的性質

- (1) 肉汁寒天で培養した培養細胞は、 $0.5 \sim 0.7 \times 1.5 \sim 3.0 \mu m$ のかん菌
- (2) グラム染色は陽性
- (3) $30^\circ C$ 2～3日の培養で内生胞子を形成、 $0.5 \sim 0.7 \times 0.8 \sim 1.5 \mu m$ の長円形
- (4) 胞子は胞子のうのはぼ中央に位置し、胞子のうの膜らみは殆ど認められない
- (5) 周毛により運動
- (6) 抗酸染色は陰性

B. 培養的性質

- (1) 普通寒天培養： $30 \sim 45^\circ C$ 、1～3日の培養でよく生育する
- (2) 肉汁寒天培養：生育は良好で培養は茶色クリーム様を呈し、拡散性色素は生産しない
- (3) 肉汁液体培養：表面に白色の菌膜を形成する
- (4) 肉汁ゼラチン穿刺培養：菌状に液化される
- (5) 肉汁ゼラチン斜面培養：菌状に液化される
- (6) 耐食塩性： 10% 食塩添加肉汁寒天培養上で生育する
- (7) 生育温度： $25 \sim 45^\circ C$ の温度範囲でよく生育するが、 $55^\circ C$ では生育しない
- (8) 嫌気条件下での生育は認められない
- (9) OF テスト：O 型
- (10) ヒューレイフゾン培養による糖の利用性：
D-グルコース、L-アラビノース、D-キシロース、D-マンニトール、ソルビトール、シュクロースからの糖の生成が認められるが、ガスの発生は認められない

イノシトール、ラムノース、メリビオース、ラフィノースからの糖とガスの生成は認められない

以上の菌学的性質を有する BN 1001 株をバーギズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリアロジー 1988 年版 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1988) に記載された既知菌種と比較し、好気性のグラム陽性かん菌

で内生胞子を作り、カタラーゼ陽性であることから本株はバチルス属に所属すると判定、更に胞子と菌子のうの形態および各菌の生理的性質よりバチルス・サブチリスに所属すると同定した。しかし、典型的なバチルス・サブチリスとはnヘキサン抽出物質の低減量、スクラムの分解、脱臭、浄水化、土壌改質化、飼料効率化、増進促進化等に関する有用性を示す点で異なっており、新菌株とした。本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌第11132号(FERM P-11132)として寄託されている。

(実験例)

以下、本菌の製造例および得られた培養生菌体、生菌剤を使用した試験例を示すが、本発明はこれらに限定されたものではない。

製造例 1

水道水15Lにグルコース75g、肉エキスを105g、ペプトン150g、塩化ナトリウム45gを溶解させ、pHを7.2に調整した培地を30Lジャーファーマンターに入れ、121℃で30分間煮沸し、冷却後これ

にあらかじめ前培養しておいたバチルス・サブチリスBN1001の培養液を接種し、30℃で24時間通気攪はん培養した。

このようにして得た培養液をバチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体としても利用できる。が、この培養液にパーライトを加えて混合し、更にこれを乾燥後粉砕することにより、バチルス・サブチリスBN1001の生菌剤1.3kgが得られる。この生菌剤に含まれる生菌数は 1×10^8 個/gであった。

製造例 2

市販大豆粕1kgにpHを7に調整したコーンステープリカー(CSL)500g、水道水300gを加え、よく混合し、121℃で60分間煮沸し、予め前培養しておいたバチルス・サブチリスBN1001の培養液を接種し、30℃で120時間培養した。このようにして得られた培養液に炭酸カルシウムを混合してバチルス・サブチリスBN1001の生菌剤1.6kgを得た。この生菌剤に含まれる生菌数は 1×10^8 個/gであった。

試験例 1

コーン油1000ppm、酵母エキス0.3%、リン酸二水素アンモニウム0.1%、塩化カリウム0.02%、硫酸マグネシウム0.02%、pH7.8の油菌培地に製造例1で調製したバチルス・サブチリスBN1001の生菌剤を入れ、30℃で22時間振とう反応させ、nヘキサン抽出物質の量を測定した。その結果を第1表に示す。

第1表

	nヘキサン抽出物質
反応開始前	1030 ppm
反応終了後	140 ppm

試験例 2

各種油類について試験例1に記載した方法で試験し、減少量を試験開始時のnヘキサン抽出物質で除し、その比率を油類分解力として第2表に示す。

第2表

	油類分解力		油類分解力
オリーブ油	74%	ゴマ油	64%
米ヌカ油	73	大豆油	80
サフラワー油	88	なたね油	62
つばき油	73	ヤシ油	72
綿実油	92	パーム油	84

試験例 3

菓子工場の排水(原水)をサンプリングし、製造例1で調製したバチルス・サブチリスBN1001の生菌剤を入れ、30℃で22時間振とう反応させ、nヘキサン抽出物質の量を測定した。その結果を第3表に示す。

第3表

	nヘキサン抽出物質
反応前	160 ppm
反応後	10 ppm

試験例 4

中華レストランの排水処理槽（6トン容量）に製造例1で得た生菌剤を初回に50ppm、以後2週間毎に50ppmを、さらに調理場の流しより毎日5gづつを投入し、固化したスカムの変化をみた。その結果、2週間後には、表面が黒ずみ、やや軟化の状態を示し、4週間後には、明らかに軟化、上から手で押すと表面が見える程になった。

なお、生菌剤投入前には、スカム周辺から悪臭が充満していたが、2週間後には消臭した。3カ月後には、スカムの固化した状態はなくなった。

試験例 5

ファミリーレストランの排水処理槽（12トン容量の合併槽）に製造例1で調製した生菌剤を試験例4と同じ方法で投入した。試験例4と同じくスカムは固化しており上から手でつついても割れず、水をかけても軟化し難い状態を示していた。更に悪臭がひどく、周辺より苦情が多く、レストランの関係者は困っていた。

生菌剤の投入を開始して、排水処理槽のスカムの状態の変化、放流水の透視度および処理槽およ

びその周辺の臭気を観察した。水の透視度は透視計を使用、臭気はポータブル型ニオイセンサーXP-329型（新コスモス電気株式会社製）を使用、スカムの状態は肉眼観察した。なお現場試験に先立ち、不快臭の強い排水を排水処理槽からサンプリングし、これを三角フラスコに入れ、製造例1で得た生菌剤を投入したものとし、臭気についてnヘキサン抽出物質の量及び臭気の測定を実施した。なお生菌剤の投入は試験開始時のみとし、30℃で振とう反応した。フラスコでの試験結果を第4表に、現場試験での結果を第5表に示した。

臭気の測定

ニオイセンサーは排水処理槽の風上から5～10m離れた不快な臭気を感じないところでの臭気を100に調整して、排水処理槽とその付近の臭気を測定した。この数値が高い程、不快臭の強いことを意味し、単位はない。

130～150の数値レベル：やや臭気を感じる程度
200～250の数値レベル：臭気として誰もが認め

臭程度

300以上の数値レベル：誰もが不快感を訴えるほどの臭気

第4表 ファミリーレストランでの悪臭水採取試験結果

	臭気(単位なし)		nヘキサン抽出物質	
	生菌剤の投入		生菌剤の投入	
	無し	有り	無し	有り
試験開始前	340	340	250 ppm	250
1日後				
1週間後	370	285	260	20
2週間後	410	205		
3週間後	395	110		

第4表に示す通り、生菌剤を投入した区では、臭気、nヘキサン抽出物質の量が減っている。第5表の現場試験結果もフラスコ試験の結果を裏付けている。即ち、生菌剤を投入することにより、透視度の向上が図られると同時に悪臭が抑制され、かつnヘキサン抽出物質の量も減ることから、

ファミリーレストランやホテル等の食堂厨房施設で利用できる。

第5表 ファミリーレストランでの現場試験結果

	排水の透視度	槽内の臭気	付近の臭気	スカムの状態
試験開始時	3 cm	330	230	数cmの盛り
1カ月後	8	185	125	表面が黒く、側面あり
2カ月後	13	135	105	ソフト化してくる
3カ月後	23	130	100	液面が所々に見える

臭気の単位は、ない（周辺との比較値である。臭気の測定参照）

試験例 6

うづら場から排出される糞1kgに製造例1の生菌剤5gを入れ、1カ月後の臭気を試験例1に示した方法で測定した結果、試験開始時450あった臭気が130と減っていた。

また、うづら場現場にて糞1トンあたり5gを毎日投入、さらに1週間毎に250gを投入し、2カ月毎通気臭気を測定した結果、試験開始時280あった臭気が130と減り、減臭の効果を認め、うづら場及びこれと類似する養豚場、養鶏場などで

の利用が考えられる。

試験例 7

観賞魚水槽(60L容量)に製造例1の生菌剤20~60mgを毎日投入した結果、投入まもなく魚臭が消失、さらに水槽の水の交換も約1~2週間遅らせることができた。なお、魚が本生菌剤の投入により死ぬということとはなかった。即ち、家庭あるいは観賞魚場での利用が可能である。

試験例 8

家庭から排出される生ゴミに製造例1の生菌剤3~5gを就寝前に入れた結果、翌朝には満ちが気付かない程に消臭した。同じ現象を不快感を発生している脱し、風呂場、洗濯機室、トイレでも効果を確証した。また、脱しや風呂場でのスルスルした状態がなくなり、家庭での既に悪臭が発生している場所あるいはこれから悪臭が発生すると予想される所での利用が可能である。

試験例 9

製造例1の生菌剤3~5gを土壌500gに配合したものとし、朝顔の苗を育て、その

成長を比較した結果、生菌剤を入れた方が無菌処理区に比べて約6~10%長く生長し、得られた種子の数は約1割多かった。

また、臭気の強い土壌に製造例1の生菌剤を混ぜあわせた結果、1~2日して臭気は消失。この土壌にネギを植え一般土壌と比較した結果、朝顔同様、ネギの生長に約5%程の差を認め、収穫量の増大が図れる結果を得た。

試験例 10

製造例2の生菌剤50ppm量を市販ブロイラー飼料用(くみあい飼料)の飼料に添加したものとし、生後2~3日のブロイラーに給与して成長試験を実施した。結果は第6表に示す通りである。

表6 表

	生菌剤の添加	
	無し	有り
飼育日数	49日	49
試験開始時平均体重	43g	43
試験終了時平均体重	1900g	2067
平均増体重	1857g	2024
増体重指数	100	109
平均飼料摂取量	4253g	4412
飼料要求率	2.29	2.18

第6表に示すように、本発明の生菌剤を添加した配合飼料を給与することにより、大幅な増体効果がみられるとともに飼料要求率も改善することができた。

〔発明の効果〕

本発明は、新法に分離されたバチルス・サブテリスB N I O D に属するものであり、これを含油排水、不快感を放つ排水廃物に投入するこ

とにより、脱臭効果、脱臭効果および排水効果を奏し、さらに土壌に配合することにより植物生長促進効果、有機肥料化の改善効果を、さらに動物に給与することにより、増体効果、飼料効率の改善効果といった多機能の広範囲かつ卓越した効果を奏するものである。

また本発明は、副作用のない安全な排水廃物処理剤として、あるいは飼料添加剤として環境改善、排水廃物処理、農業、畜産業、水産業といった各技術分野において重要な役割を果たすものである。

出願人 明治製菓株式会社

手続補正書(自発)

平成2年3月22日

特許庁長官 吉田文政 殿

1. 事件の表示

平成2年 特許第 第 29544号

2. 発明の名称

有用微生物及びその利用方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号

名称 明治製菓株式会社

代表者 佐井 聖



4. 補正命令の日付 なし

5. 補正により増加する請求項の数

なし

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容 別紙のとおり

8. 明細書第17頁 第4表を次のとおり訂正する。

	臭気(単位 なし)		nヘキサン抽出物質	
	生菌剤の投入		生菌剤の投入	
	無し	有り	無し	有り
試験開始時	340	340	250 ppm	250
1 日 後			260	20
1 週間 後	370	285		
2 週間 後	410	205		
3 週間 後	395	110		

1. 明細書第7頁上から第10行目

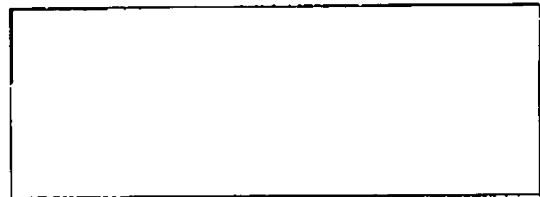
「臭気」を「臭気値」に訂正する。

2. 同・第9頁上から第6行目

「脱臭反応」を「脱臭反応」に訂正する

3. 同・第14頁 第2表の外側の囲いの線で下記の引き過ぎた

部分の線をけす。



この引き過ぎた部分の線をけす。

4. 同・同頁第3表

「反応前」を「反応開始時」に

「反応後」を「反応終了後」に訂正する。

5. 同・第16頁下から7行目

「風上; から5~10」を「風上; 5~10」に訂正する。